

Rec'd PCT/PTO 04 APR 2005

PCT/JP03/12732

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2002年10月 4日

REC'D 21 NOV 2003

WIPO PCT

出願番号
Application Number:

特願2002-291953

[ST. 10/C]: [JP2002-291953]

出願人
Applicant(s):

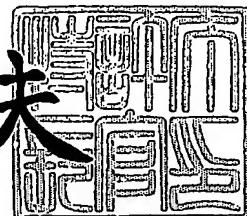
三菱ウェルファーマ株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 YK02011
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K039/00
C12P021/08

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルフ
アーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 平川容子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルフ
アーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 金子寿枝

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルフ
アーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 大池進介

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルフ
アーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 田川俊明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルフ
アーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 細川斎子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 ゾイジー
ン株式会社内

【氏名】 芳山美子

【特許出願人】

【識別番号】 000006725

【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100082511

【氏名又は名称】 高柳 昌生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013114

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0114651

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】抗体認識抗原

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原。

【請求項2】 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較してその存在量が増加していることを特徴とする請求項1に記載の抗原。

【請求項3】 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較して、その細胞表面の存在量が増加していることを特徴とする請求項1又は2に記載の抗原。

【請求項4】 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の抗原。

【請求項5】 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体の一部であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の抗原。

【請求項6】 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体のタンパク質配列のC末端側配列であることを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載の抗原。

。

【請求項7】 請求項1から6のいずれかに記載の抗原を認識するリガンド。

【請求項8】 抗体であることを特徴とする請求項7に記載のリガンド。

【請求項9】 モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7又は8に記載のリガンド。

【請求項10】 モノクローナル抗体が、ヒト型モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7から9のいずれかに記載のリガンド。

【請求項11】 癌反応性のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7から10のいずれかに記載のリガンド。

【請求項12】 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする請求項11に記載のリガンド。

【請求項13】 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項7から請求項12のいずれかに記載のリガンド。

。

【請求項14】配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする請求項7から請求項13に記載のリガンド。

【請求項15】請求項7から14のいずれかに記載のリガンドを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項16】ターゲッティング療法剤であることを特徴とする請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】癌組織又は癌細胞をターゲットとすることを特徴とする請求項15から16に記載の医薬組成物。

【請求項18】抗癌剤、抗腫瘍性タンパク質、酵素、遺伝子又は治療用アイソトープを含有することを特徴とする請求項15から17のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項19】抗癌剤であることを特徴とする請求項15から18のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項20】癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする請求項15から19のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項21】リポソームを含有することを特徴とする請求項15から20のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項22】請求項7から14のいずれかに記載のリガンドを含有する標識剤。

【請求項23】癌組織又は癌細胞を特異的に標識することを特徴とする請求項22に記載の標識剤。

【請求項24】癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする請求項22又は23に記載の標識剤。

【請求項25】蛍光剤、酵素、アイソトープ又はMRI造影剤を含有することを特徴とする請求項22から24のいずれかに記載の標識剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞が腫瘍塊を形成することにより細胞表面に露出することを特徴とする抗原に関する発明である。より具体的には、固形腫瘍において細胞表面に露出する非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体の一部を、抗原として認識する有用な医薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

現在、抗癌剤としての高い効果と安全性を得るために、癌細胞に対する抗体を用いた癌ターゲティング剤の研究が進められている。例えば、胃癌及び大腸癌との反応性からスクリーニングされたヒト型モノクローナル抗体がGAH抗体として知られており（特許文献1参照、特許文献2参照）、該抗体を結合した薬剤封入リポソーム（特許文献3参照）の開発が進められている。

【0003】

一方、癌化する細胞の種類により、該細胞を認識する抗体の種類も異なることが知られており、抗体が結合した薬剤封入リポソームを癌ターゲッティング剤として利用する場合には、該抗体が認識する抗原を同定することは、抗癌剤としてのより高い効果と安全性を得るために必要であると考えられる。しかしながら、これまでのところGAH抗体に関しては該抗体が認識する抗原の同定には至っていなかった。

【0004】

また、これまでに、マウス線維芽細胞株L929から精製したミオシン重鎖をウサギに免疫して得た抗体が、L929その他の細胞表面に反応するという報告があるが（非特許文献1参照、非特許文献2参照）、ヒト非筋肉型ミオシン重鎖タイプA（以下nmMHC）が癌化によって細胞表面に露出するという報告はなく、さらに該タンパク質が癌関連抗原として報告されている例はない。

【0005】

【特許文献1】特開平4-346918号公報

【特許文献2】特開平5-304987号公報

【特許文献3】特開平4-346918号公報

【非特許文献1】Willingham M.C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.

A. 71, 4144

【非特許文献2】 Olden K. (1976) Cell 8, 383-390

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、特開平5-304987号公報で開示されているヒト型モノクローナル抗体(GAH抗体)の認識する抗原を同定し、該抗体を含む薬剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねてきた結果、特開平5-304987号公報で開示されているヒト型モノクローナル抗体(GAH抗体)がヒト非筋肉型ミオシン重鎖タイプA(以下nmMHCA)を認識することを見出した。すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

【0008】

(1) 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原。

【0009】

(2) 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較してその存在量が増加していることを特徴とする前記に記載の抗原。

【0010】

(3) 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較して、その細胞表面の存在量が増加していることを特徴とする前記に記載の抗原。

【0011】

(4) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体であることを特徴とする前記に記載の抗原。

【0012】

(5) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体の一部であることを特徴とする前記に記載の抗原。

【0013】

(6) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体のタンパク質配列のC末

端側配列であることを特徴とする前記に記載の抗原。

【0014】

(7) 前記に記載の抗原を認識するリガンド。

【0015】

(8) 抗体であることを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0016】

(9) モノクローナル抗体であることを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0017】

(10) モノクローナル抗体が、ヒト型モノクローナル抗体であることを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0018】

(11) 癌反応性のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0019】

(12) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0020】

(13) 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含むことを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0021】

(14) 配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする前記に記載のリガンド。

【0022】

(15) 前記に記載のリガンドを含有することを特徴とする医薬組成物。

【0023】

(16) ターゲッティング療法剤であることを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0024】

(17) 癌組織又は癌細胞をターゲットとすることを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0025】

(18) 抗癌剤、抗腫瘍性タンパク質、酵素、遺伝子又は治療用アイソトープを含有することを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0026】

(19) 抗癌剤であることを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0027】

(20) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0028】

(21) リポソームを含有することを特徴とする前記に記載の医薬組成物。

【0029】

(22) 前記に記載のリガンドを含有する標識剤。

【0030】

(23) 癌組織又は癌細胞を特異的に標識することを特徴とする前記に記載の標識剤。

【0031】

(24) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記に記載の標識剤。

【0032】

(25) 蛍光剤、酵素、アイソトープ又はMRI造影剤を含有することを特徴とする前記に記載の標識剤。

【0033】**【発明の実施の形態】**

以下、本発明を詳細に説明する。

【0034】

本発明における細胞とは、胃、大腸、食道、乳、肺、肺癌、肝臓、腎臓、卵巣

又は子宮由来の細胞が挙げられる。好ましくは胃、大腸、食道又は乳由来の細胞が挙げられる。より好ましくは大腸由来の細胞が挙げられる。

【0035】

本発明において腫瘍塊とは、可視的、微視的に腫瘍細胞の集合体を形成するものであればいかなるものでもよい。好ましくは、正常組織が自然発生的に固形癌化したり、癌細胞の移植により該細胞が増殖したものが挙げられる。より好ましくは培養癌細胞の皮下移植により形成した固形腫瘍が挙げられる。

【0036】

本発明における露出とは、抗原の全体又はその一部が細胞の表面に現れることをいい、好ましくは、抗原の一部が細胞の表面に現れるということをいう。さらに好ましくは、抗原のタンパク質配列のC末端側が細胞の表面に現れることをいう。

【0037】

本発明における抗原とは、正常細胞においては細胞骨格や細胞内小器官として機能していると考えられるタンパク質、糖タンパク質、タンパク質脂質複合体が挙げられる。好ましくは、細胞が腫瘍塊を形成することにより抗原として機能するものが挙げられる。さらに好ましくはミオシン、アクチン、トロポミオシン、ビメンチン、サイトケラチン等が挙げられる。最も好ましくはヒト非筋肉型ミオシン重鎖タイプA（以下nmMHCA）が挙げられる。

【0038】

nmMHCAは、Toothaker LEらの方法[Blood, vol. 78 (7), pp. 1826-1833, 1991]や、Saez CGらの方法[Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb;87(3):1164-8]に従って遺伝子を取得し、該遺伝子を用いて、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition, Cold Spring Harbor LaboratoryPress, 1989)に従いタンパク質を発現させれば良い。

【0039】

本発明の存在量とは、細胞全体における抗原の存在量又は細胞表面のみにおける抗原の存在量を示すが、好ましくは細胞表面のみにおける抗原の存在量を示す。細胞表面の存在量は、フローサイトメトリーによって定量することが可能である。

【0040】

本発明の増加とは、3倍以上増加することが挙げられるが、好ましくは4倍以上、より好ましくは10倍以上増加することが挙げられる。

【0041】

本発明の変異体とは、1又は数個のアミノ酸を欠失、置換又は付加したアミノ酸配列を有するもの、又は正常のタンパクの立体的構造が変化したものが挙げられる。

【0042】

本発明のリガンドとは、各種抗体、線維芽細胞成長因子（FGF）、上皮細胞成長因子（EGF）等の成長因子又は増殖因子等のタンパク質が挙げられるが、好ましくは抗体が挙げられる。また、抗体としては各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトマウスキメラ抗体又はヒト型モノクローナル抗体が挙げられるが、好ましくはヒト型モノクローナル抗体が挙げられる。さらに好ましくは癌反応性のヒト型モノクローナル抗体が挙げられる。また、モノクローナル抗体は、癌反応性であることが好ましく、より好ましくは胃癌、大腸癌、食道癌、肺癌、乳癌、肝癌、卵巣癌、子宮癌又は肺瘍等の癌細胞や癌組織に反応する抗体が挙げられる。さらにより好ましくは特開平5-304987号公報で開示されているヒト型モノクローナル抗体（GAH抗体）が挙げられる。

【0043】

GAH抗体において、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列は、重鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれ、同様に配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列は、軽鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれる。かかる領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものであり、相補性決定部とも呼ばれる。従って、かかる超可変領域以外の領域は他の抗体由来であっても構わない。すなわち、GAH抗体と同様の超可変領域を有する抗体はGAH抗体と同様に本発明において使用できると考えられる。

【0044】

従って、本発明に使用されるモノクローナル抗体としては、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に

、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含むものである。これらのアミノ酸配列は、通常、重鎖及び軽鎖の各鎖の3つの超可変領域に、N末端側から、配列表の配列番号1、2及び3並びに配列表の配列番号4、5及び6の順でそれぞれ含まれる。本発明においては、癌との反応性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明において使用できるモノクローナル抗体に含まれる。

【0045】

本発明において使用されるモノクローナル抗体は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製し、上記の特定のアミノ酸配列を有するものを選択することによって得ることができる。

【0046】

ハイブリドーマは、A. Imamらの方法〔Cancer Research 45, 263 (1985)〕に準じて、まず、癌患者から摘出された癌所属のリンパ節から、リンパ球を単離し、ポリエチレン glycol を用いてマウスミエローマ細胞と融合して得られる。得られたハイブリドーマの上清を用いて、パラフォルムアルデヒド固定した各種癌細胞株に対し、エンザイムイムノアッセイにより陽性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングを行う。

【0047】

さらに、ハイブリドーマの上清から、常法〔R. C. Duhamelら、J. Immunol. Methods 31, 211 (1979)〕によりモノクローナル抗体を精製し、蛍光物質でラベルし、生癌細胞株、各種の赤血球、白血球等に対する反応性をフローサイトメトリーで検出することにより、生癌細胞株に対しては反応性を示す抗体を、赤血球、白血球に対しては、反応性を示さない抗体を選別する。また、癌患者から摘出される癌組織から単離される癌細胞、及び同一患者の同一組織の非癌部から単離される正常細胞に対する反応性を比較して、癌細胞に、より多量の抗体が結合し、正常細胞には反応がないか、もしくは健常人由来の抗体と同程度の反応性しかない抗体を選別する。

【0048】

かくして選別されたハイブリドーマが産生する抗体をコードするDNAの塩基

配列は、たとえば、以下の方法によって得られる。抗体産生ハイブリドーマから、チオシアノ酸グアニジン-塩化リチウム法 [Casaraら, DNA, 2, 329 (1983)] で mRNA を調製して、オリゴ (dT) プライマーを用いてその cDNA ライブライリーを作製する。次いで、cDNA に (dG) テーリングを行い、この dG テールにハイブリダイズするポリ C と、既に遺伝子が取得されているヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の各々共通な配列部分をプローブとして PCR 法によって、抗体をコードする cDNA を増幅させる。その後、DNA の末端平滑化を行い、電気泳動法によってゲルから切りだした DNA を pUC119 等のクローニングベクターに挿入し、Sanger らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] によってその塩基配列が決定される。この塩基配列に基づいて、上記特定のアミノ酸配列を有するものを選別できる。

【0049】

また、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、遺伝子工学的な手法により作製することもできる。

【0050】

本発明において特に好適なモノクローナル抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が夫々配列表の配列表の配列番号 7 及び 8 のアミノ酸配列で表されるものである。重鎖及び軽鎖の定常領域の塩基配列は、例えば Nucleic Acids Research 14, 1779 (1986)、The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982) 及び Cell 22, 197 (1980) に記載のものと同じ配列を有するものでよい。

【0051】

本抗体は、本抗体を產生するハイブリドーマを牛胎児血清含有 eRDF、RPMI 1640 培養液等を用いて培養するか、又は、上記の特定の超可変領域を含む可変領域をコードする DNA にさらに重鎖及び軽鎖の定常領域をコードする DNA が夫々連結された遺伝子を化学合成し、その遺伝子の発現を可能とする公知の種々の発現ベクター、例えば、動物細胞における発現ベクターとして、pKCRH2 [三品ら、Nature, 307, 605 (1984)] から特開平5-304987号公報の図

1又は図2に示した手順で構築することができるpKCR(△E)/HとpKCRDに挿入し、CHO細胞(チャイニーズハイスター卵巣細胞)等の宿主中で発現させることにより得ることができる。例えば、重鎖遺伝子の両端に Hind III部位を付加したものをpKCR(△E)/HのHind III部位に挿入し、またこのプラスミドのSal I部位にDHF R遺伝子等の選択マーカー遺伝子を挿入する。一方、軽鎖遺伝子の両端にはEco RI部位を付加したものをpKCR DのEco RI部位に挿入し、さらにこのプラスミドのSal I部位にもDHF R遺伝子を挿入する。両プラスミドをCHOd hfr-[Urlaub G. & Chasin L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)]等の細胞にリン酸カルシウム法で導入し、ヌクレオチドを含まないαMEM培養液等で増殖する細胞から、さらに抗体を産生する細胞を選別することによって得ができる。抗体は、これらの細胞を培養した培養液から、プロテインAをセルロファイン、アガロース等の支持体に結合させたカラム等に吸着し、溶出させること等によって精製される。

【0052】

本発明の癌とは、例えばペプチド又はタンパク質として抗体を使用する場合、該抗体が反応性を有する可能性のある癌種が挙げられる。好ましくは胃癌、大腸癌、食道癌、肺癌、乳癌、肝癌、卵巣癌、子宮癌又は肺癌が挙げられる。さらに好ましくは、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌が挙げられる。

【0053】

本発明の医薬組成物としては、リガンド単独、あるいはリガンドに作用性物質を結合したターゲッティング療法剤が挙げられるが、好ましくは、ターゲッティング療法剤が挙げられる。ターゲッティング療法剤は、リガンドに作用性物質が直接結合したもの、リガンドに作用物質が水溶性高分子を介して結合したもの、リガンドに作用性物質を含有した微粒子が結合したものが挙げられる。微粒子としてはマイクロスフェア、ミセル又はリポソームが挙げられるが、好ましくはリポソームが挙げられる。リポソームの中には医薬品や標識剤が封入されていても良い。これらに封入する医薬品としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ビンプラスチン、シスプラチン、マイトマイシン、ブレオマイシン、アクチノマ

イシン、フルオロウラシル（5-FU）の抗腫瘍剤、及びそれらの薬学的に許容しうる塩及び誘導体が挙げられる。また、リシンAやジフテリアトキシンの毒素タンパク質及びそれをコードするDNA、TNFのサイトカイン遺伝子をコードするDNA、アンチセンスDNAにスクレオチド類が挙げられる。特に好ましくはアドリアマイシンが挙げられる。又、これらに封入する標識剤としては放射性元素、例えばインジウム、テクネシウムのイメージング薬剤や、ホースラディシユパー・オキシダーゼ、アルカリフォスファターゼの酵素、ガドリニュームのMR-I造影剤、ヨーソのX線造影剤、CO₂の超音波造影剤、ユーロピウム誘導体、カルボキシフルオレッセインの蛍光体、N-メチルアクリジウム誘導体の発光体が挙げられる。水溶性高分子誘導体としては、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリグリセリン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリアミノ酸の合成高分子が挙げられ、好ましくはポリエチレングリコールが挙げられる。該ターゲッティング療法剤は癌組織又は癌細胞をターゲットとすることがより好ましい。癌としては、胃癌、大腸癌、食道癌、肺癌、乳癌、肝癌、卵巣癌、子宮癌、又は肺癌が挙げられる。好ましくは、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌が挙げられる。

【0054】

リガンドが結合した作用性物質及び水溶性分子誘導体の複合体は、特開平5-304987号公報、特開平4-346918号公報又は特開平6-220070号公報により製剤化することができ、該複合体を、癌等の各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱投与、腹腔内投与、局所投与等の方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の抗腫瘍性物質の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したリポソームを投与する場合には、有効成分量として50mg/kg以下、好ましくは10mg/kg以下、より好ましくは5mg/kg以下で用いることができる。

【0055】

【実施例】

以下、本発明を実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例には限定されない。

【0056】**実施例 1**

抗体の反応性比較及び免疫沈降による細胞表面抗原の検出。

【0057】**皮下移植由来MKN45細胞の調製**

ヒト胃癌細胞MKN45（日本免疫生物研究所）を牛胎児血清（シグマ社）を10%含む液体培地eRDF（ギブコ社）で培養し、細胞を回収して5週齢前後のBALB/Cヌードマウス（日本クレア）の背部皮下に移植した。形成された皮下腫瘍組織を摘出し、時田らの方法〔癌の臨床、32, 1803(1986)〕に従って組織からの細胞の単離を行った。組織をゴム板の上に敷いたテフロン（登録商標）シートにのせ、カミソリで叩いて細切し、ナイロンメッシュ（FALCON社 セルストレーナー）を通して結合組織を除去した。濾液である細胞懸濁液を1500回転5分間遠心し（トミー卓上遠心機LC06-SP）、浮遊した脂肪と懸濁した壊死部分を捨て、沈査を繰り返し洗浄した。

【0058】**フローサイトメトリーによるGAH抗体の反応性比較**

MKN45の培養細胞、あるいは皮下移植腫瘍由来細胞に、フルオレッセインイソチアネート（FITC：シグマ社）標識GAH抗体を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で4°C1時間反応させ、リン酸緩衝化生理的食塩水（PBS）で1回洗浄した。プロピジウムアイオダイド（PI：シグマ社）を含むPBS中でフローサイトメータ（FACScan：ベクトンディッキンソン社）を用いて解析した。PI陽性細胞すなわち死細胞はゲーティング操作により解析の対象から除外した。FITC蛍光強度を表す指標であるFL1の平均チャンネル数を求めて培養細胞、移植由来細胞間の比較を行った。

【0059】

その結果、GAH抗体は移植腫瘍由来細胞に対して約18倍という、より強い反応性を示した。結果を図1に示す（縦軸は平均チャンネル数から、抗体を含まない場合の値をバックグラウンド値（BG）として差し引いた値を示す）。

【0060】

細胞の表面のビオチン標識及び可溶化上清の調製

MKN45の培養細胞、あるいは移植由来細胞にビオチン試薬（sulfonyl NHS-biotin: PIERCE社）の1mg/ml PBS溶液を加え、4℃で30分振とうしながらインキュベートした。その後5mMグリシン（ナカライ社）を含むPBS、ついでPBSで洗浄した。細胞のペレットに150mM NaCl、1mMEDTAを含む20mMトリス（シグマ社）塩酸緩衝液PH7.5、（TNEバッファー）に1%NP40、アプロチニン（シグマ社）、メシリ酸ナフアモスタッフ（鳥居薬品社）を含む溶液を加えて攪拌、超音波処理し、氷上1時間放置後、15000rpm10分間（トミー小型冷却遠心機MRX-150）遠心して、上清を細胞の可溶化上清とした。

【0061】免疫沈降及びbiotin標識バンドの検出

PBSで平衡化したプロテインAセファロースCL4B（ファルマシア社）にGAH抗体、又は健常人血清由来ヒト免疫グロブリン（ヒトIgG）（スキャンティボディズラボラトリー社から入手したヒト血清からプロテインAカラム（レプリジェン社）を用いて精製した）溶液を加えて抗体を樹脂に結合させたものをPBSで洗浄し、細胞の可溶化上清を添加して4℃一晩振とうしながらインキュベートした。遠心して上清を除去した後、樹脂を0.1%NP40（ナカライ社）を含むTNEバッファーで3回洗浄し、SDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）用サンプルバッファーで抽出してSDS-PAGE（グラジエントゲル4～12%）を行い、PVDF膜（ミリポア社）にウエスタン blottingを行った。タンパクが転写された膜を、0.1%ゼラチン（ナカライ社）及び0.05%Tween20（ナカライ社）を含むPBSで室温1時間インキュベートした後、biotin標識タンパクを検出するためにベクトスティンエライトABC（Vectastain Elite ABC:ベクター社）で室温1時間反応させた。発色にはコニカイムノステインHRP1000（コニカ社）を用いた。

【0062】

その結果、移植腫瘍由来細胞で分子量約200kDaの位置にGAH抗体特異的な

バンドが検出された。培養細胞由来では相当する位置にバンドはほとんど検出されなかった。結果を図2に示す（図中レーン1は、移植由来細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン2は培養細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン3は移植由来細胞のヒトIgGsによる免疫沈降物、レーン4は培養細胞のヒトIgGsによる免疫沈降物である）。

【0063】

200k dタンパクのアミノ酸配列解析

免疫沈降で特異的に検出された200k dタンパクをポリアクリルアミドゲルから切り出し、リジルエンドペプチダーゼ（和光純薬社）処理後逆相クロマトグラフィーで得られたピークについてアミノ酸配列解析を行った（配列表の配列番号9から16）。

【0064】

これらの配列を元にホモロジー検索を行ったところ、ヒト非筋肉型ミオシンA鎖（nmMHC A）と一致した（配列表の配列番号17）。

【0065】

抗非筋肉型ミオシン重鎖（nmMHC）抗体による検出

プロッキング操作の後、抗nmMHCウサギポリクローナル抗体（Biomedical Technologies社）溶液中で室温1時間反応した。抗体の陰性コントロールとして、ノーマルウサギ免疫グロブリン（ノーマルウサギIgG：バイオジェネシス社）を用いた。2次抗体として抗ウサギIgGのペルオキシダーゼ標識体（カペル社）の溶液中で反応した後、コニカイムノステインHR P1000にて発色させた。

【0066】

その結果、培養細胞、皮下移植腫瘍由来細胞いずれの場合でもGAH抗体により免疫沈降された約200k dのタンパクが検出された。結果を図3に示す（図中レーン1，2，3は移植由来細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン4，5は培養細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン1，4はVectastain Elite ABCで検出、レーン2，5は抗nmMHC抗体で検出、レーン3，6はノーマルウサギIgGで検出したものである）。

【0067】

実施例2

nmMHCA強制発現株を用いた検証。

【0068】

nmMHCA発現ベクターの作製

nmMHCA遺伝子であるHA1.0とHALES (Robert S. Adelsteinより提供) を、制限酵素EcoRI (宝酒造社) にて切断した。一方、nmMHCA遺伝子を組込む側のほ乳類細胞遺伝子発現用プラスミドベクターpEF1/Myc-HisB (インビトロジェン社) も同様に制限酵素EcoRI切断を行い、次いでBAPにて脱リン酸化処理を行った。nmMHCA遺伝子断片と、pEF1/Myc-HisB断片をライゲーションし、トランسفォーメーションして、HA1.0を組み込んだもの(pEF1B-HA1.0と名付けた)、HALESを組み込んだもの(pEF1B-HALESと名付けた)を得た。nmMHCA全長ほ乳類細胞発現用ベクターの調製は、pEF1B-HA1.0を鋳型として、配列表の配列番号18のプライマーと配列表の配列番号19のプライマーを用い、PCR反応(Advantage cDNA PCR kit クロンテック社)を行った。このPCR産物をKpnI-HA1.0-SpeIと名付けた。一方で、pEF1B-HALESを制限酵素KpnIとSpeI (いずれも宝酒造社) にて切断した。KpnI-HA1.0-SpeIをpEF1B-HALES制限酵素切断物に挿入し、次いで大腸菌の形質転換を行った。得られたクローンのプラスミドのマッピングを行って、目的であるnmMHCA全長ほ乳類細胞発現用ベクターが作製されたことを確認した。

【0069】

COS-7強制発現細胞株の作製

ほ乳類細胞遺伝子発現用プラスミドベクターpEF1/Myc-HisB (インビトロジェン社) にnmMHCA遺伝子を組み込み、培養したアフリカミドリザル腎臓由来細胞株COS-7細胞 (東北大学加齢研究所医用細胞資源センターより入手) に、ポリフェクト (PolyFect : キアゲン社) を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞を37℃、5% CO₂存在下にて培養し、48時間後に一過性発現細胞株として免疫沈降の実験に用いた。安定発現株は、遺伝子導入後、37℃ 5% CO₂存在下にて培養し、ジェネテシンG418 (シグマ社) により安定発現株の薬剤選択を行うことで樹立した。また、nmMHCA安定発現株を用いた試験を行う

際に、遺伝子導入操作、薬剤選択操作による細胞株への影響を考慮するため、ネガティブコントロールとしてCOS-7のmock細胞を作製した。mock細胞は、nmMHCA遺伝子を組み込んだ際に使用したプラスミドの、プラスミド部分(pEF1/myc-HisB)のみを用いて、COS-7細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、薬剤選択を行うことで作製した。

【0070】

HCT-15安定発現株の作製

COS7と同様な方法で、ヒト大腸癌細胞株HCT-15細胞（東北大学加齢研究所医用細胞資源センターより入手）を用いたnmMHCA遺伝子導入安定発現株の作製を行った。HCT-15においてもmock細胞を作製した。

【0071】

GAH抗体による免疫沈降

COS-7のnmMHCA一過性発現細胞と非導入細胞の各々をスクレイパーで回収し、0.5mlの可溶化バッファーを加えて超音波処理（出力2、頻度50%）を5秒間行い、細胞を破碎した。氷上1時間放置した後、マイクロチューブ遠心機にて15000rpm 10分遠心分離し可溶化上清を得た。得られた上清に含まれるタンパク濃度をそろえるため、実施例1と同様にBCAタンパク解析キット（BCA protein Assay kit：ピアース社）を用いてタンパク定量を行った。免疫沈降についても実施例1と同様に行い、免疫沈降物及び、比較のため可溶化上清についてSDS-PAGE（ゲル濃度6%）を行い、ウエスタンプロットティングを行った。膜をブロッキングバッファー(0.1%ゼラチン及び0.05%Tween 20を含むPBS、0.05% sodium azide (和光純薬社))中で室温1時間インキュベートし、抗nmMHC抗体をブロッキングバッファーで100倍に希釈して室温1時間反応させた。反応後PBST(0.05% Tween20を含むPBS)で室温5分間ずつ3回洗浄し、抗ウサギIgG-HRP標識抗体をHRP標識体希釈バッファー(0.1%ゼラチンを含むPBS)で1500倍に希釈したものを室温1時間反応させた。反応後PBSTで室温5分間ずつ3回洗浄し、発光基質ECL(アマシャム社)を用いてバンドを検出した。

【0072】

その結果、nmMHCA一過性発現株のみにおいてGAH抗体特異的にnmMHCAが免疫沈

降された。結果を図4に示す（図中レーン1～3はnmMHCA導入細胞で、レーン1は可溶化上清、レーン2はGAH抗体による免疫沈降物、レーン3はヒトIgsによる免疫沈降物を示す。またレーン4～6はmock細胞で、レーン4は可溶化上清、レーン5はGAH抗体による免疫沈降物、レーン6はヒトIgsによる免疫沈降物を示す。また「nmMHCA」はnmMHCAの分子量に相当する約200Kdのバンドの位置を示す）。

【0073】

ウエスタンプロッティングによる nmMHCA 安定発現株取得確認

COS-7、HCT-15共に薬剤選択後の安定発現株及びmockを、スクレイパーにより回収し、SDS-PAGEサンプルバッファーを加えて超音波処理を行い、細胞を破碎した。調製したサンプルのタンパク濃度をBCA protein Assay kitにて定量した。各サンプルのタンパク量をそろえてSDS-PAGE（ゲル濃度6%）、ウエスタンプロット、及び抗nmMHC抗体による検出をおこなった。

【0074】

その結果、nmMHCAの分子量である約200Kdのバンドが図5a) レーン2及び図5b) レーン4及びレーン7から9で、mock細胞と比べて濃いことが認められ、安定発現株が作製されたことを確認した。結果を図5に示す。

【0075】

nmMHCA発現細胞株を用いたヌードマウス移植癌細胞切片の免疫染色

HCT-15 の各種 nmMHCA安定発現株をマトリゲル（ベクトンディッキンソン社）に懸濁し、ヌードマウス背部皮下に 5×10^6 cells/spot となるよう 2箇所ずつ移植した。腫瘍の生着性を確認した後摘出し、一部を10% ホルマリン-PBS に浸して奈良病理研究所にてパラフィン切片の作製及びヘマトキシリン-エオジン(HE) 染色を行った。

【0076】

切片はキシレン、エタノールを用いて脱パラフィンし、10mM sodium citrate, pH6.0 buffer に浸してマイクロウェーブを照射し（600W 5分を3回）、30分間室温放置して空冷した後 5%(w/v) BSA-PBSAz 溶液に1時間浸した。ビオチン標識 F(ab')2 化 GAH 抗体 66 μg/ml、あるいはビオチン標識抗 nmMHC 抗体

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 37°C で 2 時間インキュベートし、続いてストレプトアビジン PerCP (ベクトンディッキンソン社) 溶液2.5 倍希釈液と氷冷遮光下で 30 分反応させた。反応終了後、オリンパス落射蛍光顕微鏡 BX-50 を用いて各切片の同視野における PerCP の赤色蛍光を観察した。

【0077】

その結果、GAH抗体の反応性は、対照として用いた組織切片 (HCT-15 mock細胞) に対しては弱いものであったが、nmMHCA発現株に対しては強い反応性が示された。さらに抗 nmMHC 抗体では、nmMHCA 安定発現株切片のみで明確な染色性が認められ、その染色像は GAH 抗体と類似していた。結果を図6に示す。

【0078】

nmMHCA安定発現細胞株を用いたGAH抗体生細胞反応性

nmMHCA安定発現株をマトリゲルに懸濁し、ヌードマウス背部皮下に 5×10^6 cells/spot となるよう 2 箇所ずつ移植した。腫瘍の生着性を確認した後摘出し、細切して腫瘍細胞を採取した。FITC標識GAH 抗体、あるいは FITC 標識 ヒトイムノグロブリンをヒト血清 (スキャンティボディズラボラトリーズ社) で $33 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう希釈した。また FITC 標識抗 nmMHC 抗体、あるいは FITC 標識ウサギ IgG をヒト血清で $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう希釈した。これらの抗体液を各腫瘍細胞と良く混和して遮光氷冷下で 1 時間反応させた。反応終了後 0. 1% sodium azide を含む PBS にて細胞を洗浄し、ベクトンディッキンソン BD-LSR を用いて以下の通りフローサイトメトリー解析を行った。細胞を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ PI を含むFACSflow (フローサイトメーター付属バッファー) 溶液に懸濁し、実施例1と同様に PI 陽性細胞すなわち死細胞はゲーティング操作により解析の対象から除外し、生細胞集団における細胞1個当たりのFITC蛍光強度の平均値を求めた。同条件下で測定した結合FITC分子数既知の標準蛍光ビーズ (フローサイトメトリースタンダーズ社) の蛍光強度の平均値より検量線を作成し、各試料の蛍光強度平均値を結合FITC量に換算した。さらに得られた値を各FITC標識抗体の F/P 値で除して抗体結合数とした。

【0079】

その結果、COS-7及びHCT-15共にnmMHCA安定発現株においてmock細胞株に比べ

てGAH反応性が増加していることが示された。結果を図7に示す。

【0080】

【発明の効果】

本発明によれば、固体腫瘍において細胞表面に露出する非筋肉型ミオシン重鎖タイプA又はその変異体の一部を、抗原として認識する有用な医薬の提供が可能である。

【0081】

【配列表】

<110> 三菱ウェルファーマ株式会社 (Mitsubishi Pharma Corporation)

<120> 抗体認識抗原

<130> Y K 0 2 0 1 1

<160> 19

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Youko, Hirakawa; Hisae, Kaneko; Shinsuke, Ooike; Toshiaki, Tagawa; Saiko, Hosokawa; Yoshiko, Yoshiyama

<400> 1

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

1

5

10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr

1

5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Cys

20 25 30

Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn
 20 25 30
Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Val Trp Val Pro Ser Asp Lys

1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Ser His Leu Leu Gly Ile Asn Val Thr Asp Phe Thr Arg Gly Ile

1 5 10 15

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Gln Ala Asp Phe Ala Ile Glu Ala Leu Ala Lys

1

5

10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 12

Asp Val Asp Arg Ile Ile Gly Leu Asp Gln Val Ala Gly Met Ser Glu

1

5

10

15

Thr

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 13

Thr Glu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Ser Thr Ala Ala Gln Gln Glu
1 5 10 15

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 14

Ala Leu Glu Ser Gln Leu Gln Asp Thr Gln Glu Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 15

Ser Met Glu Ala Glu Met Ile Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 16

Arg Arg Leu Glu Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Leu Glu Glu

1

5

10

15

Glu

<210> 17

<211> 1960

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 17

Met Ala Gln Gln Ala Ala Asp Lys Tyr Leu Tyr Val Asp Lys Asn Phe

1

5

10

15

Ile Asn Asn Pro Leu Ala Gln Ala Asp Trp Ala Ala Lys Lys Leu Val

20

25

30

Trp Val Pro Ser Asp Lys Ser Gly Phe Glu Pro Ala Ser Leu Lys Glu

35 40

45

Glu Val Gly Glu Glu Ala Ile Val Glu Leu Val Glu Asn Gly Lys Lys

50 55 60

Val Lys Val Asn Lys Asp Asp Ile Gln Lys Met Asn Pro Pro Lys Phe

65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Asp Met Ala Glu Leu Thr Cys Leu Asn Glu Ala Ser

85 90 95

Val Leu His Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Tyr Ser Gly Leu Ile Tyr Thr

100 105 110

Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Val Ile Asn Pro Tyr Lys Asn Leu Pro

115 120 125

Ile Tyr Ser Glu Glu Ile Val Glu Met Tyr Lys Gly Lys Lys Arg His

130 135 140

Glu Met Pro Pro His Ile Tyr Ala Ile Thr Asp Thr Ala Tyr Arg Ser
145 150 155 160

Met Met Gln Asp Arg Glu Asp Gln Ser Ile Leu Cys Thr Gly Glu Ser
165 170 175

Gly Ala Gly Lys Thr Glu Asn Thr Lys Lys Val Ile Gln Tyr Leu Ala
180 185 190

Tyr Val Ala Ser Ser His Lys Ser Lys Lys Asp Gln Gly Glu Leu Glu
195 200 205

Arg Gln Leu Leu Gln Ala Asn Pro Ile Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala
210 215 220

Lys Thr Val Lys Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg
225 230 235 240

Ile Asn Phe Asp Val Asn Gly Tyr Ile Val Gly Ala Asn Ile Glu Thr
245 250 255

Tyr Leu Leu Glu Lys Ser Arg Ala Ile Arg Gln Ala Lys Glu Glu Arg

260

265

270

Thr Phe His Ile Phe Tyr Tyr Leu Leu Ser Gly Ala Gly Glu His Leu

275

280

285

Lys Thr Asp Leu Leu Leu Glu Pro Tyr Asn Lys Tyr Arg Phe Leu Ser

290

295

300

Asn Gly His Val Thr Ile Pro Gly Gln Gln Asp Lys Asp Met Phe Gln

305

310

315

320

Glu Thr Met Glu Ala Met Arg Ile Met Gly Ile Pro Glu Glu Gln

325

330

335

Met Gly Leu Leu Arg Val Ile Ser Gly Val Leu Gln Leu Gly Asn Ile

340

345

350

Val Phe Lys Lys Glu Arg Asn Thr Asp Gln Ala Ser Met Pro Asp Asn

355

360

365

Thr Ala Ala Gln Lys Val Ser His Leu Leu Gly Ile Asn Val Thr Asp

370

375

380

Phe Thr Arg Gly Ile Leu Thr Pro Arg Ile Lys Val Gly Arg Asp Tyr
385 390 395 400

Val Gln Lys Ala Gln Thr Lys Glu Gln Ala Asp Phe Ala Ile Glu Ala
405 410 415

Leu Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Arg Met Phe Arg Trp Leu Val Leu Arg
420 425 430

Ile Asn Lys Ala Leu Asp Lys Thr Lys Arg Gln Gly Ala Ser Phe Ile
435 440 445

Gly Ile Leu Asp Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Leu Asn Ser Phe
450 455 460

Glu Gln Leu Cys Ile Asn Tyr Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Leu Phe
465 470 475 480

Asn His Thr Met Phe Ile Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Gln Arg Glu Gly
485 490 495

Ile Glu Trp Asn Phe Ile Asp Phe Gly Leu Asp Leu Gln Pro Cys Ile

500 505 510

Asp Leu Ile Glu Lys Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ile Leu Ala Leu Leu

515 520 525

Asp Glu Glu Cys Trp Phe Pro Lys Ala Thr Asp Lys Ser Phe Val Glu

530 535 540

Lys Val Met Gln Glu Gln Gly Thr His Pro Lys Phe Gln Lys Pro Lys

545 550 555 560

Gln Leu Lys Asp Lys Ala Asp Phe Cys Ile Ile His Tyr Ala Gly Lys

565 570 575

Val Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Trp Leu Met Lys Asn Met Asp Pro Leu

580 585 590

Asn Asp Asn Ile Ala Thr Leu Leu His Gln Ser Ser Asp Lys Phe Val

595 600 605

Ser Glu Leu Trp Lys Asp Val Asp Arg Ile Ile Gly Leu Asp Gln Val

610

615

620

Ala Gly Met Ser Glu Thr Ala Leu Pro Gly Ala Phe Lys Thr Arg Lys

625

630

635

640

Gly Met Phe Arg Thr Val Gly Gln Leu Tyr Lys Glu Gln Leu Ala Lys

645

650

655

Leu Met Ala Thr Leu Arg Asn Thr Asn Pro Asn Phe Val Arg Cys Ile

660

665

670

Ile Pro Asn His Glu Lys Lys Ala Gly Lys Leu Asp Pro His Leu Val

675

680

685

Leu Asp Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu Gly Ile Arg Ile Cys

690

695

700

Arg Gln Gly Phe Pro Asn Arg Val Val Phe Gln Glu Phe Arg Gln Arg

705

710

715

720

Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Ser Ile Pro Lys Gly Phe Met Asp Gly

725

730

735

Lys Gln Ala Cys Val Leu Met Ile Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn

740

745

750

Leu Tyr Arg Ile Gly Gln Ser Lys Val Phe Phe Arg Ala Gly Val Leu

755

760

765

Ala His Leu Glu Glu Glu Arg Asp Leu Lys Ile Thr Asp Val Ile Ile

770

775

780

Gly Phe Gln Ala Cys Cys Arg Gly Tyr Leu Ala Arg Lys Ala Phe Ala

785

790

795

800

Lys Arg Gln Gln Gln Leu Thr Ala Met Lys Val Leu Gln Arg Asn Cys

805

810

815

Ala Ala Tyr Leu Lys Leu Arg Asn Trp Gln Trp Trp Arg Leu Phe Thr

820

825

830

Lys Val Lys Pro Leu Leu Gln Val Ser Arg Gln Glu Glu Glu Met Met

835

840

845

Ala Lys Glu Glu Glu Leu Val Lys Val Arg Glu Lys Gln Leu Ala Ala

850 855 860

Glu Asn Arg Leu Thr Glu Met Glu Thr Leu Gln Ser Gln Leu Met Ala

865 870 875 880

Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Glu Thr Glu Leu Cys

885 890 895

Ala Glu Ala Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Thr Ala Lys Lys Gln Glu

900 905 910

Leu Glu Glu Ile Cys His Asp Leu Glu Ala Arg Val Glu Glu Glu

915 920 925

Glu Arg Cys Gln His Leu Gln Ala Glu Lys Lys Met Gln Gln Asn

930 935 940

Ile Gln Glu Leu Glu Glu Gln Leu Glu Glu Glu Ser Ala Arg Gln

945 950 955 960

Lys Leu Gln Leu Glu Lys Val Thr Thr Glu Ala Lys Leu Lys Lys Leu
965 970 975

Glu Glu Glu Gln Ile Ile Leu Glu Asp Gln Asn Cys Lys Leu Ala Lys
980 985 990

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Asp Arg Ile Ala Glu Phe Thr Thr Asn Leu
995 1000 1005

Thr Glu Glu Glu Glu Lys Ser Lys Ser Leu Ala Lys Leu Lys Asn
1010 1015 1020

Lys His Glu Ala Met Ile Thr Asp Leu Glu Glu Arg Leu Arg Arg
1025 1030 1035

Glu Glu Lys Gln Arg Gln Glu Leu Glu Lys Thr Arg Arg Lys Leu
1040 1045 1050

Glu Gly Asp Ser Thr Asp Leu Ser Asp Gln Ile Ala Glu Leu Gln
1055 1060 1065

Ala Gln Ile Ala Glu Leu Lys Met Gln Leu Ala Lys Lys Glu Glu
1070 1075 1080

Glu Leu Gln Ala Ala Leu Ala Arg Val Glu Glu Glu Ala Ala Gln
1085 1090 1095

Lys Asn Met Ala Leu Lys Lys Ile Arg Glu Leu Glu Ser Gln Ile
1100 1105 1110

Ser Glu Leu Gln Glu Asp Leu Glu Ser Glu Arg Ala Ser Arg Asn
1115 1120 1125

Lys Ala Glu Lys Gln Lys Arg Asp Leu Gly Glu Glu Leu Glu Ala
1130 1135 1140

Leu Lys Thr Glu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Ser Thr Ala Ala Gln
1145 1150 1155

Gln Glu Leu Arg Ser Lys Arg Glu Gln Glu Val Asn Ile Leu Lys
1160 1165 1170

Lys Thr Leu Glu Glu Ala Lys Thr His Glu Ala Gln Ile Gln

1175

1180

1185

Glu Met Arg Gln Lys His Ser Gln Ala Val Glu Glu Leu Ala Glu

1190

1195

1200

Gln Leu Glu Gln Thr Lys Arg Val Lys Ala Asn Leu Glu Lys Ala

1205

1210

1215

Lys Gln Thr Leu Glu Asn Glu Arg Gly Glu Leu Ala Asn Glu Val

1220

1225

1230

Lys Val Leu Leu Gln Gly Lys Gly Asp Ser Glu His Lys Arg Lys

1235

1240

1245

Lys Val Glu Ala Gln Leu Gln Glu Leu Gln Val Lys Phe Asn Glu

1250

1255

1260

Gly Glu Arg Val Arg Thr Glu Leu Ala Asp Lys Val Thr Lys Leu

1265

1270

1275

Gln Val Glu Leu Asp Asn Val Thr Gly Leu Leu Ser Gln Ser Asp

1280

1285

1290

Ser Lys Ser Ser Lys Leu Thr Lys Asp Phe Ser Ala Leu Glu Ser

1295 1300

1305

Gln Leu Gln Asp Thr Gln Glu Leu Leu Gln Glu Glu Asn Arg Gln

1310 1315 1320

Lys Leu Ser Leu Ser Thr Lys Leu Lys Gln Val Glu Asp Glu Lys

1325 1330 1335

Asn Ser Phe Arg Glu Gln Leu Glu Glu Glu Glu Ala Lys His

1340 1345 1350

Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ala Thr Leu His Ala Gln Val Ala Asp

1355 1360 1365

Met Lys Lys Lys Met Glu Asp Ser Val Gly Cys Leu Glu Thr Ala

1370 1375 1380

Glu Glu Val Lys Arg Lys Leu Gln Lys Asp Leu Glu Gly Leu Ser

1385 1390 1395

Gln Arg His Glu Glu Lys Val Ala Ala Tyr Asp Lys Leu Glu Lys
1400 1405 1410

Thr Lys Thr Arg Leu Gln Gln Glu Leu Asp Asp Leu Leu Val Asp
1415 1420 1425

Leu Asp His Gln Arg Gln Ser Ala Cys Asn Leu Glu Lys Lys Gln
1430 1435 1440

Lys Lys Phe Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ala
1445 1450 1455

Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asp Arg Ala Glu Ala Glu Ala Arg Glu
1460 1465 1470

Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ser Leu Ala Arg Ala Leu Glu Glu Ala
1475 1480 1485

Met Glu Gln Lys Ala Glu Leu Glu Arg Leu Asn Lys Gln Phe Arg
1490 1495 1500

Thr Glu Met Glu Asp Leu Met Ser Ser Lys Asp Asp Val Gly Lys

1505

1510

1515

Ser Val His Glu Leu Glu Lys Ser Lys Arg Ala Leu Glu Gln Gln

1520

1525

1530

Val Glu Glu Met Lys Thr Gln Leu Glu Glu Leu Glu Asp Glu Leu

1535

1540

1545

Gln Ala Thr Glu Asp Ala Lys Leu Arg Leu Glu Val Asn Leu Gln

1550

1555

1560

Ala Met Lys Ala Gln Phe Glu Arg Asp Leu Gln Gly Arg Asp Glu

1565

1570

1575

Gln Ser Glu Glu Lys Lys Gln Leu Val Arg Gln Val Arg Glu

1580

1585

1590

Met Glu Ala Glu Leu Glu Asp Glu Arg Lys Gln Arg Ser Met Ala

1595

1600

1605

Val Ala Ala Arg Lys Lys Leu Glu Met Asp Leu Lys Asp Leu Glu

1610

1615

1620

Ala His Ile Asp Ser Ala Asn Lys Asn Arg Asp Glu Ala Ile Lys

1625

1630

1635

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Gln Met Lys Asp Cys Met Arg Glu

1640

1645

1650

Leu Asp Asp Thr Arg Ala Ser Arg Glu Glu Ile Leu Ala Gln Ala

1655

1660

1665

Lys Glu Asn Glu Lys Lys Leu Lys Ser Met Glu Ala Glu Met Ile

1670

1675

1680

Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ala Glu Arg Ala Lys Arg Gln

1685

1690

1695

Ala Gln Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Asp Glu Ile Ala Asn Ser

1700

1705

1710

Ser Gly Lys Gly Ala Leu Ala Leu Glu Glu Lys Arg Arg Leu Glu

1715

1720

1725

Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Gln Gly

1730

1735

1740

Asn Thr Glu Leu Ile Asn Asp Arg Leu Lys Lys Ala Asn Leu Gln

1745

1750

1755

Ile Asp Gln Ile Asn Thr Asp Leu Asn Leu Glu Arg Ser His Ala

1760

1765

1770

Gln Lys Asn Glu Asn Ala Arg Gln Gln Leu Glu Arg Gln Asn Lys

1775

1780

1785

Glu Leu Lys Val Lys Leu Gln Glu Met Glu Gly Thr Val Lys Ser

1790

1795

1800

Lys Tyr Lys Ala Ser Ile Thr Ala Leu Glu Ala Lys Ile Ala Gln

1805

1810

1815

Leu Glu Glu Gln Leu Asp Asn Glu Thr Lys Glu Arg Gln Ala Ala

1820

1825

1830

Cys Lys Gln Val Arg Arg Thr Glu Lys Lys Leu Lys Asp Val Leu
1835 1840 1845

Leu Gln Val Asp Asp Glu Arg Arg Asn Ala Glu Gln Tyr Lys Asp
1850 1855 1860

Gln Ala Asp Lys Ala Ser Thr Arg Leu Lys Gln Leu Lys Arg Gln
1865 1870 1875

Leu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Asn Ala Ser Arg
1880 1885 1890

Arg Lys Leu Gln Arg Glu Leu Glu Asp Ala Thr Glu Thr Ala Asp
1895 1900 1905

Ala Met Asn Arg Glu Val Ser Ser Leu Lys Asn Lys Leu Arg Arg
1910 1915 1920

Gly Asp Leu Pro Phe Val Val Pro Arg Arg Met Ala Arg Lys Gly
1925 1930 1935

Ala Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Val Asp Gly Lys Ala Asp Gly
1940 1945 1950

Ala Glu Ala Lys Pro Ala Glu
1955 1960

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 18
cggttaccat ggcacagcaa gctgcc 26

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 19
gactagtctt ctcgtcctcc acctgc 26

【図面の簡単な説明】

【図1】MKN45の培養細胞及び移植由来細胞に対するG A H抗体の反応性を示す図である。

【図2】MKN45の培養細胞及び移植由来細胞をbiotin標識して免疫沈降し、EliteABCを用いてbiotin標識タンパクを検出した結果を示す図である。

【図3】各種免疫沈降サンプルを、EliteABC、あるいは抗nmMHC抗体で検出した結果を示す図である。

【図4】nmHCAのCOS7細胞におけるnmHCAの一過性発現株を用いた免疫沈降の結果を示す図である。

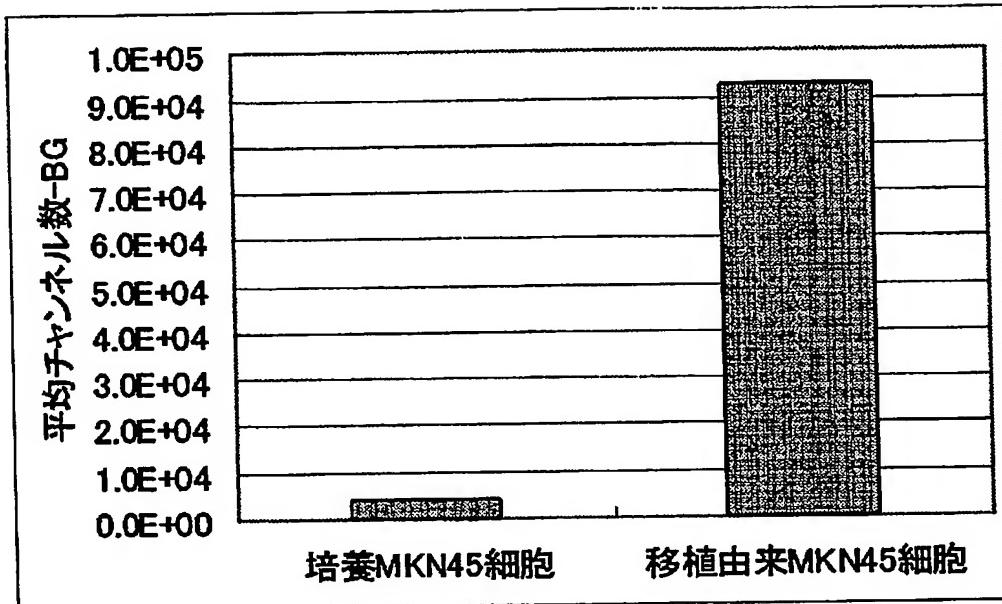
【図5】nmHCAの安定発現株におけるnmHCAの発現をSDS-PAGEウエスタンプロッティングで確認した結果を示す図である。図5a；cos-7における安定発現株取得確認、図5b；HCT-15における安定発現株取得確認

【図6】nmHCA安定発現組織切片におけるGAH、及び抗nmHCA抗体の反応性の検討結果を示す図である。

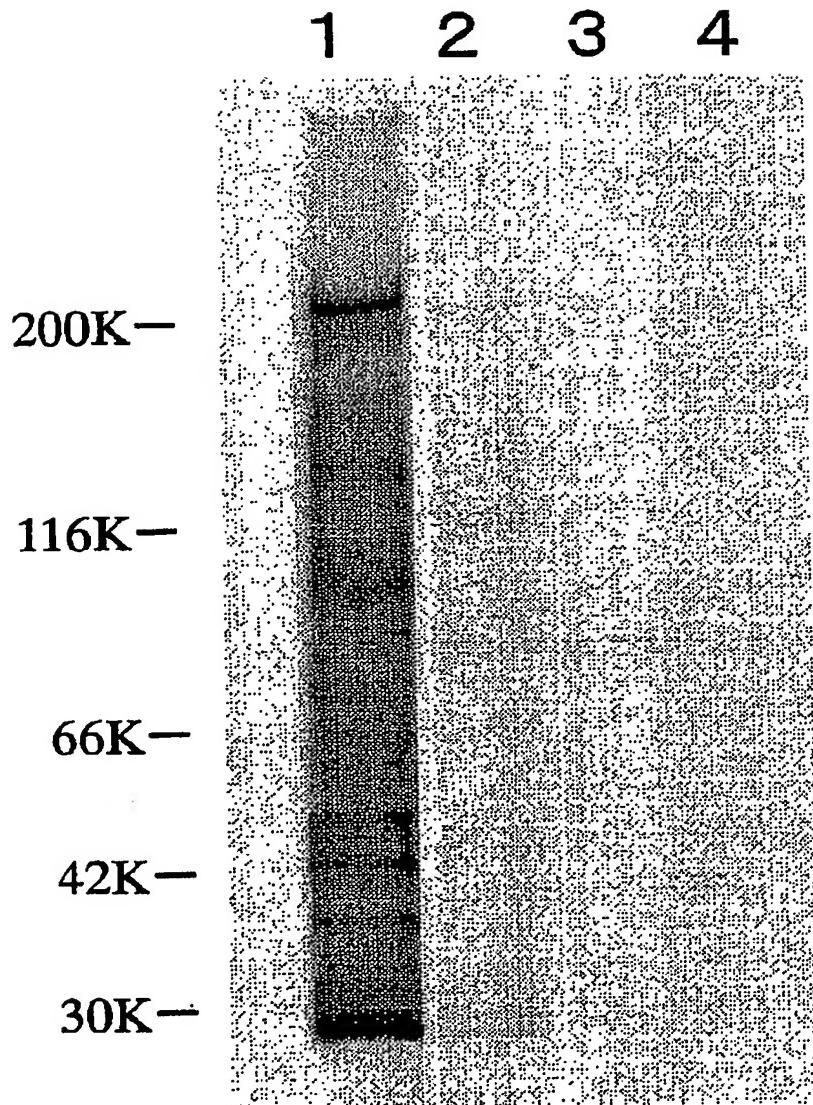
【図7】nmHCA安定発現株を用いたGAH、及び抗nmHCA抗体の細胞表面反応性の検討結果を示す図である。図7a；GAH抗体結合数、図7b；抗nmMHC抗体結合数

【書類名】 図面

【図 1】

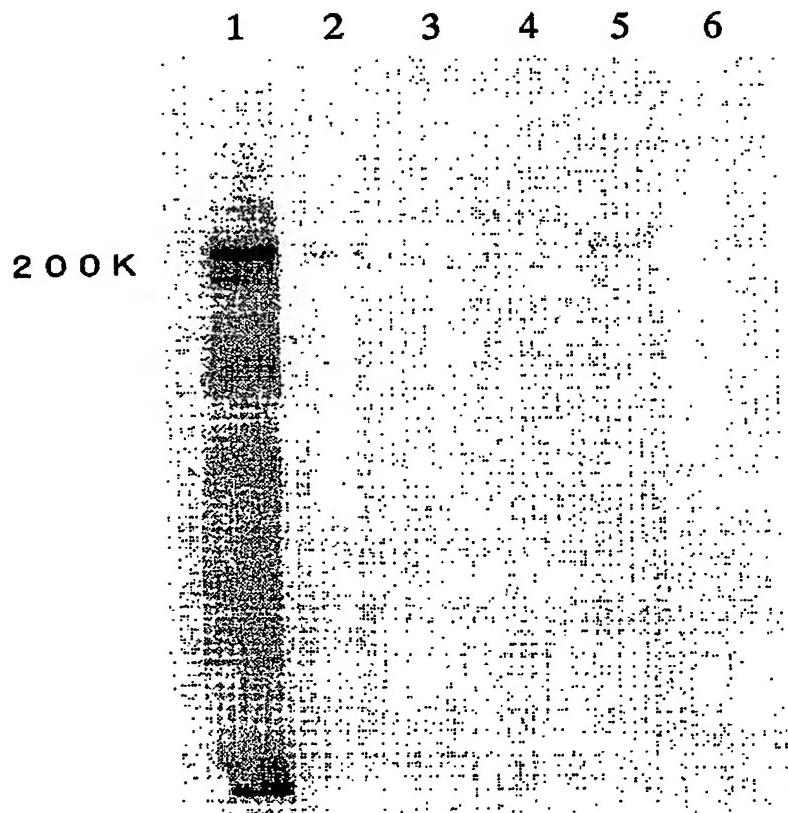


【図2】



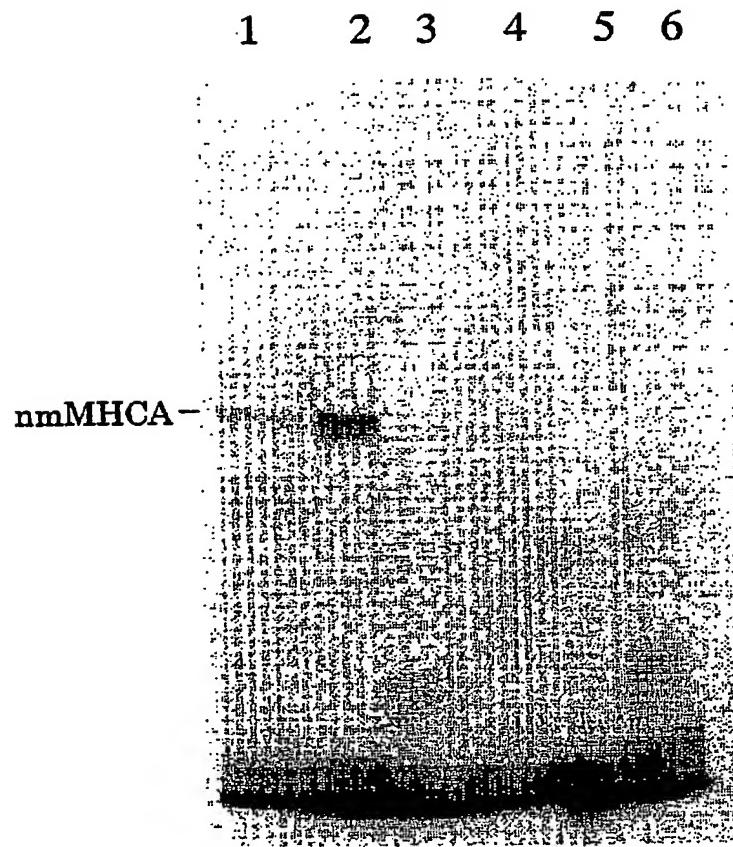
- 1 移植MKN45 GAH免疫沈降
- 2 培養MKN45 GAH免疫沈降
- 3 移植MKN45 IgG免疫沈降
- 4 培養MKN45 IgG免疫沈降

【図3】



- | | | |
|----------|-----------|------------|
| 1 皮下移植由来 | GAH抗体免疫沈降 | EliteABC |
| 2 皮下移植由来 | GAH抗体免疫沈降 | 抗nmMHC抗体 |
| 3 皮下移植由来 | GAH抗体免疫沈降 | ノーマルウサギIgG |
| 4 培養細胞 | GAH抗体免疫沈降 | EliteABC |
| 5 培養細胞 | GAH抗体免疫沈降 | 抗nmMHC抗体 |
| 6 培養細胞 | GAH抗体免疫沈降 | ノーマルウサギIgG |

【図4】

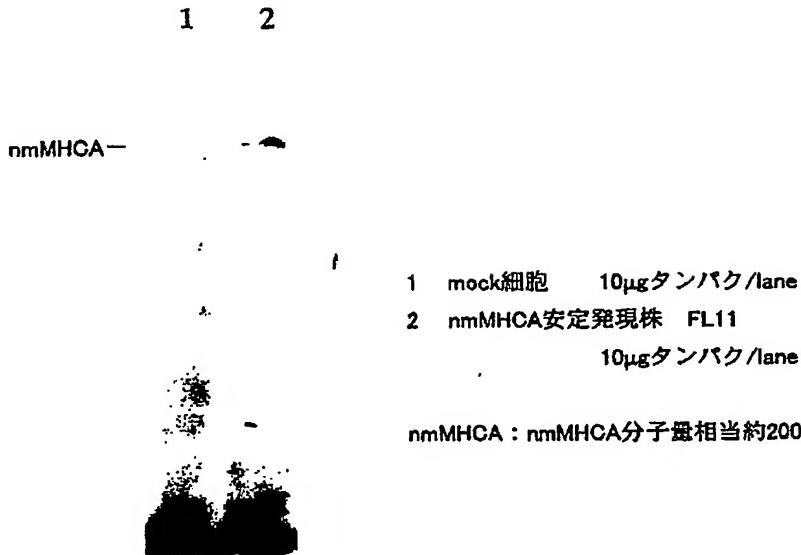


- 1 nmMHCA導入細胞 可溶化上清
- 2 nmMHCA導入細胞 GAH免疫沈降
- 3 nmMHCA導入細胞 ヒトIgs免疫沈降
- 4 mock細胞 可溶化上清
- 5 mock細胞 GAH免疫沈降
- 6 mock細胞 ヒトIgs免疫沈降

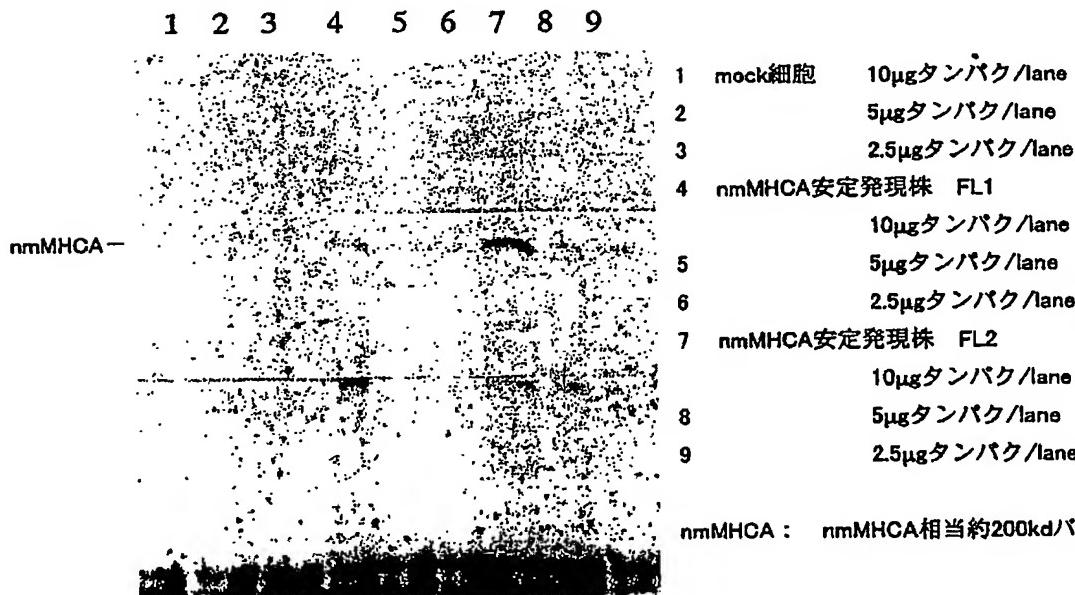
nmMHCA : nmMHCAの分子量に相当する約200kdのバンドの位置

【図 5】

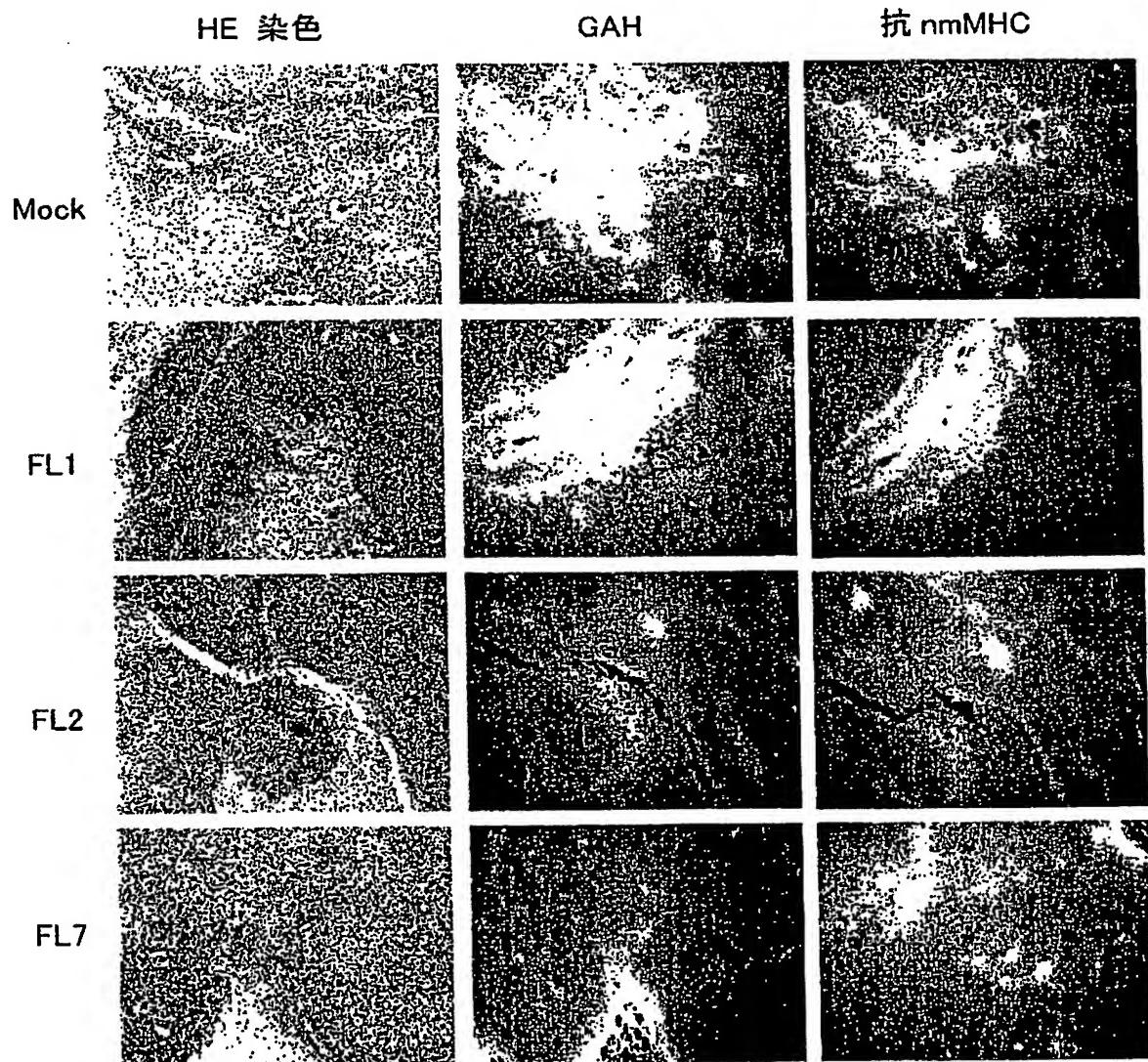
a) COS-7 における安定発現株取得確認



b) HCT-15 における安定発現株取得確認



【図 6】



【図7】

図7a GAH 抗体結合数

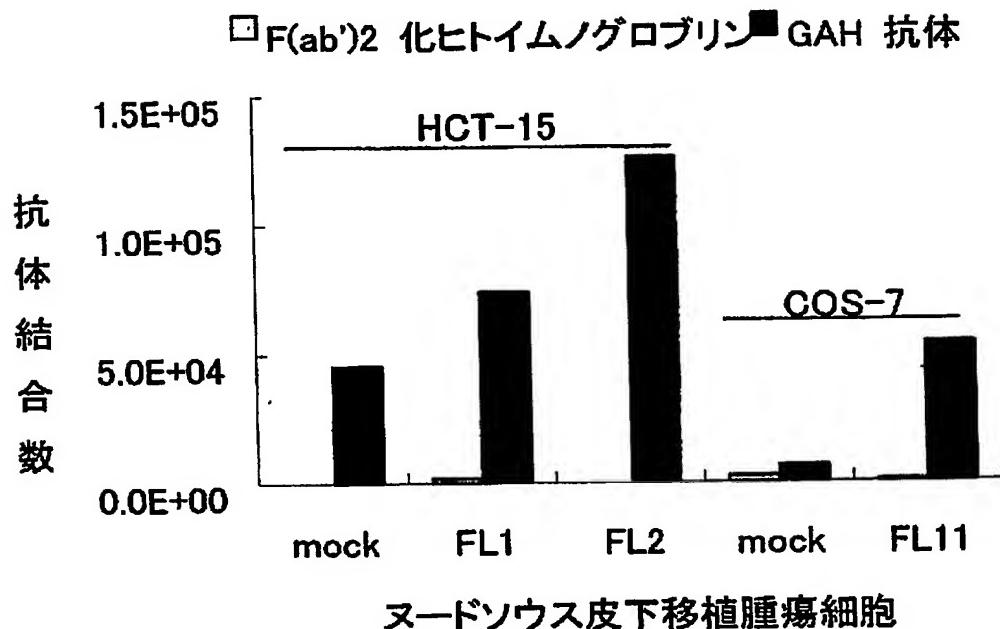
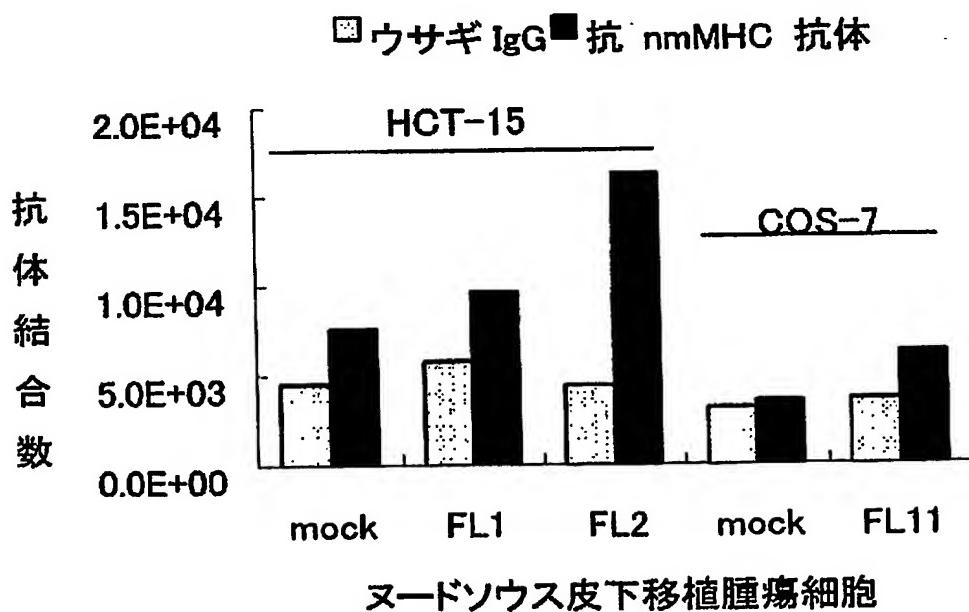


図7b 抗 nmMHC 抗体結合数



特願2002-291953

ページ： 8/E

出証特2003-3091654

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出するタンパク質を抗原として認識する有用な医薬を提供する。

【解決手段】 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出するタンパク質を抗原として認識するモノクローナル抗体を含有する医薬であり、該医薬がターゲッティング療法剤である医薬。該ターゲッティング療法剤がリポソームを含有する医薬。細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出するタンパク質を抗原として認識するモノクローナル抗体を含有する標識剤であり、該標識剤が癌に対するものである標識剤。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-291953
受付番号	50201495508
書類名	特許願
担当官	森吉 美智枝 7577
作成日	平成14年10月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年10月 4日

次頁無

特願2002-291953

出願人履歴情報

識別番号 [000006725]

1. 変更年月日 2001年10月 1日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号
氏 名 三菱ウェルファーマ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.